

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP98/08216

09/582246

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D	19 FEB 1999
WIPO	PCT

**Bescheinigung**

Die Bayer Aktiengesellschaft in Leverkusen/Deutschland hat  
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Regulatorische DNA-Sequenzen aus der 5'-Region  
vom Gen der humanen katalytischen Telomerase-  
Untereinheit und deren diagnostische und thera-  
peutische Verwendung"

am 24. Dezember 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

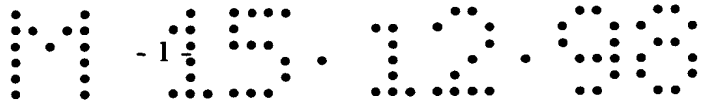
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue  
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-  
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-  
bole C 12 N, C 07 H und A 61 K der Internationalen Patent-  
klassifikation erhalten.

München, den 21. Oktober 1998  
Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Agurks



**Regulatorische DNA-Sequenzen aus der 5'-Region vom Gen der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit und deren diagnostische und therapeutische Verwendung**

5 **Aufbau und Funktion der Chromosomenenden**

Das genetische Material eukaryontischer Zellen ist auf linearen Chromosomen verteilt. Die Enden der Erbanlagen werden, abgeleitet von den griechischen Wörtern *telos* (Ende) und *meros* (Teil, Segment), als Telomere bezeichnet. Die meisten Telomere bestehen aus Wiederholungen von kurzen Sequenzen, die überwiegend aus Thymin und Guanin aufgebaut sind (Zakian, 1995). In allen bislang untersuchten Wirbeltieren werden die Telomere aus der Sequenz TTAGGG aufgebaut (Meyne *et al.*, 1989).

Die Telomere üben verschiedene wichtige Funktionen aus. Sie verhindern die Fusion von Chromosomen (McClintock, 1941) und damit die Entstehung von dizentrischen Erbanlagen. Solche Chromosomen mit zwei Centromeren können durch Verlust der Heterozygotie bzw. Verdopplung oder Verlust von Genen zur Entwicklung von Krebs führen.

Desweiteren dienen Telomere dazu, intakte Erbanlagen von beschädigten zu unterscheiden. So stellten Hefezellen ihre Zellteilung ein, wenn sie ein Chromosom ohne Telomer enthielten (Sandell und Zakian, 1993).

Eine weitere wichtige Aufgabe erfüllen Telomere bei der DNA-Replikation eukaryontischer Zellen. Im Gegensatz zu den zirkulären Genomen von Prokaryonten können die linearen Chromosomen der Eukaryonten von dem DNA Polymerase-Komplex nicht vollständig repliziert werden. Zur Initiation der DNA-Replikation sind RNA-Primer notwendig. Nach Abspaltung der RNA-Primer, Verlängerung der Okazaki-Fragmente und anschließender Ligation fehlt dem neu-synthetisierten DNA-Strang das 5'-Ende, denn dort kann der RNA-Primer nicht durch DNA ersetzt werden. Ohne besondere Schutzmechanismen würden daher die Chromosomen mit jeder Zellteilung schrumpfen ("end-replication problem"; Harley *et al.*, 1990). Die nicht-kodierenden

11.15.12.99

Telomersequenzen stellen vermutlich eine Pufferzone dar, um dem Verlust von Genen vorzubeugen (Sandell und Zakian, 1993).

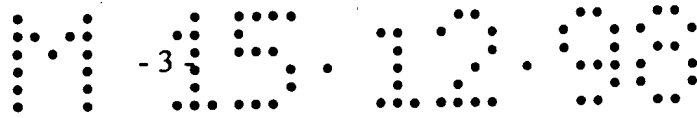
Darüberhinaus spielen Telomere auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Alterung (Olovnikov, 1973). Humane somatische Zellen zeigen in Kultur eine limitierte Replikationskapazität; sie werden nach einer gewissen Zeit seneszent. In diesem Zustand teilen sich die Zellen selbst nach Stimulierung mit Wachstumsfaktoren nicht mehr, sterben aber nicht, sondern bleiben metabolisch aktiv (Goldstein, 1990). Verschiedene Beobachtungen sprechen für die Hypothese, daß eine Zelle anhand der Länge ihrer Telomere bestimmt, wie oft sie sich noch teilen kann (Allsopp *et al.*, 1992).

Zusammenfassend besitzen die Telomere somit zentrale Funktionen bei der Alterung von Zellen sowie der Stabilisierung des genetischen Materials und Verhinderung von Krebs.

#### Das Enzym Telomerase synthetisiert die Telomere

Wie oben beschrieben können Organismen mit linearen Chromosomen ohne einen speziellen Schutzmechanismus ihr Genom nur unvollständig replizieren. Die meisten Eukaryonten verwenden zur Regeneration der Telomersequenzen ein spezielles Enzym, die Telomerase. In den bislang untersuchten Einzellern wird Telomerase konstitutiv exprimiert. Dagegen wurde in Menschen die Telomerase-Aktivität nur in Keimzellen und Tumorzellen gemessen, wogegen benachbartes somatisches Gewebe keine Telomerase enthielt (Kim *et al.*, 1994).

Funktionell kann die Telomerase auch als terminale Telomertransferase bezeichnet werden, die als Multiproteinkomplex im Zellkern lokalisiert ist. Während der RNA-Anteil der humanen Telomerase schon seit längerem bekannt ist (Feng *et al.*, 1995), wurde kürzlich die katalytische Untereinheit dieser Enzymgruppe in verschiedenen Organismen identifiziert (Lingner *et al.*, 1997; vgl. unsere Anmeldung DE-Akz. 19726329.1). Diese katalytischen Untereinheiten der Telomerase sind sowohl



untereinander als auch zu bisher allen bekannten reversen Transkriptasen auffällig homolog.

### Aktivierung der Telomerase in menschlichen Tumoren

5

Eine Aktivität der Telomerase konnte in Menschen ursprünglich nur in Keimbahnzellen, nicht aber in normalen somatischen Zellen (Hastie *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Nach der Entwicklung eines sensitiveren Nachweisverfahrens (Kim *et al.*, 1994) wurde auch in hematopoietischen Zellen eine geringe Telomeraseaktivität detektiert (Broccoli *et al.*, 1995; Counter *et al.*, 1995; Hiyama *et al.*, 1995). Allerdings wiesen diese Zellen trotzdem eine Reduktion der Telomere auf (Vaziri *et al.*, 1994; Counter *et al.*, 1995). Noch ist nicht geklärt, ob die Menge an Enzym in diesen Zellen nicht ausreichend für eine Kompensation des Telomerverlustes ist, oder ob die gemessene Telomerase-Aktivität von einer Subpopulation, z.B. unvollständig ausdifferenzierten CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup>-Vorläuferzellen, herrührt (Hiyama *et al.*, 1995). Zur Klärung wäre ein Nachweis der Telomerase-Aktivität in einer einzelnen Zelle nötig.

10

15

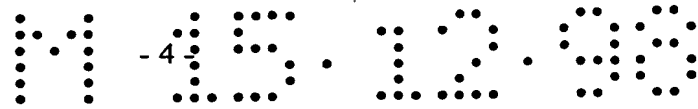
20

25

Interessanterweise wurde jedoch in einer großen Zahl der bislang getesteten Tumorgewebe eine signifikante Telomerase-Aktivität nachgewiesen (1734/2031, 85%; Shay, 1997), während in normalem somatischen Gewebe keine Aktivität gefunden wurde (1/196, <1%, Shay, 1997). Verschiedene Untersuchungen zeigten außerdem, daß in seneszenten Zellen, die mit viralen Oncoproteinen transformiert wurden, die Telomere weiterhin schrumpften und Telomerase nur in der Subpopulation entdeckt werden konnte, die die Wachstumskrise überlebte (Counter *et al.*, 1992). In diesen immortalisierten Zellen waren auch die Telomere stabil (Counter *et al.*, 1992). Ähnliche Befunde aus Untersuchungen an Mäusen (Blasco *et al.*, 1996) stützen die Annahme, daß eine Reaktivierung der Telomerase ein spätes Ereignis in der Tumorgenese ist.

30

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine "Telomerase-Hypothese" entwickelt, die den Verlust von Telomerasequenzen und Zellalterung mit der Aktivität von Telomerase und der Entstehung von Krebs verbindet. In langlebigen Spezies wie dem Menschen kann das Schrumpfen der Telomere als ein Mechanismus zur Tumorsuppression ange-



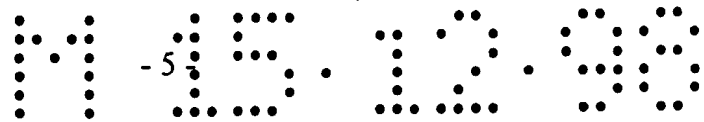
einer bestimmten Länge der Telomere ihre Zellteilung ein. Mutiert eine solche Zelle, so kann aus ihr nur dann ein Tumor entstehen, wenn die Zelle ihre Telomere verlängern kann. Ansonsten würde die Zelle weiterhin Telomersequenzen verlieren, bis ihre Chromosomen instabil werden und sie schließlich zugrunde geht. Die Reaktivierung der Telomerase ist vermutlich der Hauptmechanismus von Tumorzellen zur Stabilisation ihrer Telomere.

Aus diesen Beobachtungen und Überlegungen ergibt sich, daß eine Inhibition der Telomerase eine Therapie von Tumoren erlauben sollte. Konventionelle Krebstherapien mit Zytostatika oder kurzwelligen Strahlen schädigen nicht nur die Tumorzellen, sondern alle sich teilenden Zellen des Körpers. Da aber außer Tumorzellen nur Keimbahnzellen eine signifikante Telomerase-Aktivität enthalten, würden Telomerase-Inhibitoren spezifischer die Tumorzellen angreifen und somit weniger unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. In allen bislang getesteten Tumorgeweben wurde eine Telomerase-Aktivität nachgewiesen, so daß diese Therapeutika gegen alle Krebsarten eingesetzt werden könnten. Die Wirkung von Telomerase-Inhibitoren würde dann eintreten, wenn die Telomere der Zellen sich soweit verkürzt haben, daß das Genom instabil wird. Da Tumorzellen meist kürzere Telomere aufweisen als normale somatische Zellen, würden zuerst Krebszellen durch Telomerase-Inhibitoren eliminiert werden. Zellen mit langen Telomeren, wie die Keimzellen, würden dagegen erst viel später geschädigt werden. Telomerase-Inhibitoren stellen somit einen zukunftsweisenden Weg für die Therapie von Krebs dar.

Eindeutige Antworten auf die Frage nach der Art und den Angriffspunkten physiologischer Telomerase-Inhibitoren werden möglich sein, wenn auch die Regulation der Genexpression der Telomerase identifiziert ist.

#### Regulation der Genexpression in Eukaryonten

Die eukaryotische Genexpression, d.h. der zelluläre Informationsfluß von der DNA über die RNA zum Protein, weist vielfältige Ansatzpunkte für regulatorische Mechanismen auf. Einzelne Kontrollstufen sind z.B. die Gen-Amplifikation, Rekombination von Genloci, Chromatinstruktur, DNA-Methylierung, Transkription, posttranskrip-

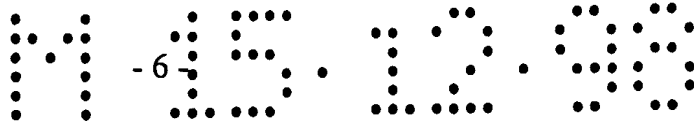


tionelle mRNA-Modifikationen, mRNA-Transport, Translation und post-translationale Proteinmodifikationen. Nach bisherigen Studien besitzt die Kontrolle auf der Ebene der Transkriptionsinitiation die größte Bedeutung (Latchman, 1991).

- 5 Unmittelbar stromaufwärts vom Transkriptionsstart eines von der RNA-Polymerase II transkribierten Gens liegt eine Region, die für die Steuerung der Transkription verantwortlich ist und als Promotorregion bezeichnet wird. Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen von Promotorregionen vieler bekannter Gene zeigt, daß bestimmte Sequenzmotive in dieser Region häufig vorkommen. Zu diesen Elementen gehören
- 10 unter anderem die TATA-Box, die CCAAT-Box und die GC-Box, die von spezifischen Proteinen erkannt werden. Die TATA-Box, die etwa 30 Nukleotide stromaufwärts vom Transkriptionsstart entfernt positioniert ist, wird z.B. von der TFIID-Untereinheit TBP („TATA-box binding protein“) erkannt, wogegen bestimmte GC-reiche Sequenzabschnitte vom Transkriptionsfaktor Sp1 („specificity protein1“) spezifisch gebunden werden.
- 15

- Funktionell kann man den Promotor in einen regulativen und einen konstitutiven Abschnitt unterteilen (Latchman, 1991). Der konstitutive Kontrollbereich umfaßt den sogenannten Kernpromotor („corepromoter“), der die korrekte Initiation der Transkription ermöglicht. Er enthält die als UPE's (upstream promoter elements“) beschriebenen Sequenzelemente, die für eine effiziente Transkription notwendig sind. Die
- 20 regulativen Kontrollabschnitte, die mit den UPE's verflochten sein können, weisen Sequenzelemente auf, die an der signalabhängigen Regulation der Transkription durch Hormone, Wachstumsfaktoren usw. beteiligt sein können. Sie vermitteln gewebs- oder zellspezifische Promotoreigenschaften.
- 25

- Ein charakteristisches Merkmal eukaryotischer Gene sind DNA-Abschnitte, die über vergleichsweise große Distanzen hinweg Einfluß auf die Genexpression nehmen können. Diese Elemente können stromaufwärts, stromabwärts oder innerhalb einer
- 30 Transkriptionseinheit lokalisiert sein und unabhängig von ihrer Orientierung ihre



beherbergen auch Enhancer und Silencer mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.

Die Erfindung betrifft die DNA-Sequenzen aus der 5'-flankierenden Region des Gens  
5 der katalytisch aktiven humanen Telomerase-Untereinheit.

Die Erfindung betrifft weiterhin die 5'-flankierende regulatorische DNA-Sequenz, enthaltend die Promotor-DNA-Sequenz für das Gen der humanen katalytischen Telomerase Untereinheit gemäß Fig 4.

10

Die Erfindung betrifft weiterhin regulatorisch wirksame Teilbereiche der 5'-flankierenden regulatorischen DNA-Sequenz gemäß Fig. 4.

15

Die Erfindung betrifft weiterhin ein rekombinantes Konstrukt, das die 5'-flankierende DNA-Sequenz des Gens der humanen katalytischen Telomerase Untereinheit oder Teilbereiche davon beinhaltet.

20

Bevorzugt sind rekombinante Konstrukte, die neben der 5'-flankierenden DNA-Sequenz des Gens der humanen katalytischen Telomerase Untereinheit oder Teilbereichen davon eine oder mehrere weitere DNA-Sequenzen, die für Polypeptide oder Proteine kodieren, enthalten.

25

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform kodieren diese weiteren DNA-Sequenzen für antitumorale Proteine.

Besonders bevorzugte antitumorale Proteine sind solche, die die Angiogenese direkt oder indirekt inhibieren. Zu diesen Proteinen zählen beispielsweise:

Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI-1), PAI-2, PAI-3, Angiostatin, Endostatin,

11.15.12.99

Perforin, Granzym, IL-2, IL-4, IL-12, Interferone, wie beispielsweise IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , Oncostatin M; Tumorsuppressorgene, wie z.B. p53, Retinoblastoma.

5

Weiterhin besonders bevorzugt sind antitumorale Proteine, welche gegebenenfalls zusätzlich zur antitumoralen Wirkung Entzündungen stimulieren und hierdurch zur Elimination von Tumorzellen beitragen. Hierzu zählen beispielsweise:

10 RANTES, Monocyte chemotactic and activating factor (MCAF), IL-8, Macrophage inflammatory protein (MIP-1 $\alpha$ , - $\beta$ ), Neutrophil activating protein-2 (NAP-2), IL-3, IL-5, human leukemia inhibitory factor (LIF), IL-7, IL-11, IL-13, GM-CSF, G-CSF, M-CSF.

15 Weiterhin besonders bevorzugt sind antitumorale Proteine, welche aufgrund ihrer Wirkung als Enzyme in der Lage sind, Vorstufen eines antitumoralen Wirkstoffes in einen antitumoralen Wirkstoff zu überführen. Zu diesen Enzymen zählen beispielsweise:

20 Herpes Simplex Virus Thymidinkinase, Varizella Zoster Virus Thymidinkinase, bakterielle Nitroreductase, bakterielle  $\beta$ -Glukuronidase, pflanzliche  $\beta$ -Glukuronidase aus *Secale cereale* humane Glukuronidase, humane Carboxypeptidase, bakterielle Car-



415.12.99

Chloramphenicolacetyltransferase (CAT), Glühwürmchen Luziferase (LUC),  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal), Sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP), Humanes Wachstumshormon (hGH),  $\beta$ -Glukuronidase (GUS), Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) und alle davon abgeleiteten Varianten, Aquarin, Obelin.

5

Die rekombinanten Konstrukte können neben der DNA, kodierend für die humane katalytische Telomerase Untereinheit, sowie deren Varianten und Fragmente auch andere Protein-Untereinheiten der humanen Telomerase und die Telomerase-RNA-Komponente enthalten.

10

Erfindungsgemäße rekombinante Konstrukte können auch DNA kodierend für die humane katalytische Telomerase Untereinheit und deren Varianten und Fragmente in antisense Orientierung enthalten. Gegebenenfalls können diese Konstrukte auch andere Protein-Untereinheiten der humanen Telomerase und die Telomerase-RNA-Komponente in antisense Orientierung enthalten.

15

Die Erfindung betrifft weiterhin einen Vektor, enthaltend die oben genannten 5'-flankierenden DNA-Sequenzen, sowie eine oder mehrere der oben genannten DNA-Sequenzen.

20

Bevorzugter Vektor für solche Konstrukte ist ein Virus, beispielsweise ein Retrovirus, Adenovirus, adeno-assoziiertes Virus, Herpes Simplex Virus, Vaccina Virus, lentivirales Virus, Sindbis Virus und ein Semliki Forest Virus.

25

Es fallen auch Plasmide als Vektoren

415.12.99

Die Zubereitungen der erfindungsgemäßen Konstrukte bzw. Vektoren in kolloidalen Dispersionssystemen können um einen Liganden ergänzt sein, der an Membranstrukturen von Tumorzellen bindet. Ein solcher Ligand kann z.B. an das Konstrukt bzw. den Vektor angeknüpft sein oder auch Bestandteil der Liposomenstruktur sein.

5

Geeignete Liganden sind insbesondere polyklonale oder monoklonale Antikörper oder Antikörperfragmente hiervon, die mit ihren variablen Domänen an Membranstrukturen von Tumorzellen binden, oder endständige Mannose-tragende Substanzen, Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Fragmente bzw. Teilsequenzen hiervon, die an Rezeptoren auf Tumorzellen binden.

10

Entsprechende Membranstrukturen sind beispielsweise Rezeptoren für ein Zytokin oder einen Wachstumsfaktor, wie z.B. IL-1, EGF, PDGF, VEGF, TGF  $\beta$ , Insulin oder Insulin-like Growth Factor (ILGF), oder Adhäsionsmoleküle, wie z. B. SLeX, LFA-1, MAC-1, LECAM-1 oder VLA-4, oder der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor.

15

Zur vorliegenden Erfindung gehören pharmazeutische Zubereitungen, die neben den erfindungsgemäßen Vektorkonstrukten auch nichttoxische, inerte, pharmazeutisch geeignete Trägerstoffe enthalten können. Vorstellbar sind die Applikation (z.B. intravenös, intraarteriell, intramuskulär, subkutan, intradermal, anal, vaginal, nasal, transdermal, intraperitoneal, als Aerosol oder oral) am Ort eines Tumors oder die systemische Applikation dieser Zubereitungen.

20

Die erfindungsgemäßen Vektorkonstrukte können in der Gentherapie eingesetzt werden

25



- 5      A.      Zugabe einer Kandidatensubstanz zu einer Wirtszelle, enthaltend die 5'-flankierende regulatorische DNA-Sequenz für das Gen der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit oder einen regulatorisch wirksamen Teilbereich davon, funktionell verknüpft mit einem Reportergen,

- B.      Messung des Substanzeffektes auf die Reportergenexpression.

10      Das Verfahren kann eingesetzt werden zur Identifizierung von Substanzen, die die Promotor-, Silencer- oder Enhanceraktivität der katalytischen Telomerase Untereinheit verstärken.

15      Das Verfahren kann weiterhin eingesetzt werden zur Identifizierung von Substanzen, die die Promotor-, Silencer- oder Enhanceraktivität der katalytischen Telomerase Untereinheit inhibieren.

20      Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung von Faktoren, die spezifisch an Fragmente der 5'-flankierenden regulatorischen DNA-Sequenz der katalytischen Telomerase Untereinheit binden. Diese Methode beinhaltet ein Screening einer Expressions-cDNA-Bibliothek mit der vorstehend beschriebenen DNA-Sequenz oder Teilfragmenten unterschiedlichster Länge als Sonde.

25      Die vorstehend beschriebenen Konstrukte bzw. Vektoren können auch zur Herstellung transgener Tiere verwendet werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Detektion Telomerase-assoziiierter Zustände in einem Patienten, das folgende Schritte umfaßt:

- 30      A.      Inkubation eines Konstruktes bzw. Vektors, enthaltend die 5'-flankierende regulatorische DNA-Sequenz für das Gen der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit oder einen regulatorisch wirksamen Teilbereich davon sowie ein Reportergen mit Körperflüssigkeiten oder zellulären Proben,



- B. Detektion der Reportergenaktivität, um einen diagnostischen Wert zu erhalten;
- C. Vergleich des diagnostischen Werts mit Standardwerten für das Reportergenkonstrukt in standardisierten normalen Zellen oder Körperflüssigkeiten des gleichen Typs wie die Testprobe;

Detektion diagnostischer Werte, die höher oder niedriger als Standardvergleichswerte liegen, indiziert einen Telomerase-assoziierten Zustand, der wiederum einen pathogenen Zustand indiziert.

Erläuterung der Abbildungen:

Fig. 1: Southern Blot-Analyse mit genomischer DNA verschiedener Spezies

Abb. 1: Foto eines Ethidiumbromid gefärbten 0,7%igen Agarosegels mit etwa 4 µg Eco RI geschnittener genomischer DNA. Die Spur 1 enthält Hind III geschnittene λ-DNA als Größenmarker (23,5, 9,4, 6,7, 4,4, 2,3, 2,0, und 0,6 kb). Die Spuren 2 bis 10 enthalten genomische DNA von Mensch, Rhesusaffe, Sprague Dawley Ratte, BALB/c Maus, Hund, Rind, Kaninchen, Huhn und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*).

Abb. 2: Zu Fig.1, Abb.1 korrespondierendes Autoradiogramm einer Southern Blot-Analyse, hybridisiert mit einer radioaktiv-markierten 1233 bp langen hTC-cDNA Sonde.

Fig. 2: Restriktionsanalyse der rekombinanten λ-DNA des Phagenklons, der mit einer Sonde aus dem 5'-Bereich der hTC-cDNA hybridisiert.

Die Abbildung zeigt ein Foto eines Ethidiumbromid gefärbten 0,4%igen Agarosegels. Die Spuren 1 und 2 enthalten Eco RI/Hind III geschnittene λ-DNA als Größenmarker (23,5, 9,4, 6,7, 4,4, 2,3, 2,0, und 0,6 kb). Die Spuren 3 bis 10 enthalten genomische DNA von Mensch, Rhesusaffe, Sprague Dawley Ratte, BALB/c Maus, Hund, Rind, Kaninchen, Huhn und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*).



I (Spur 6) und Sac I (Spur 7) geschnittene DNA des rekombinanten Phagens. Die Pfeile kennzeichnen die zwei  $\lambda$ -Arme des Vektors EMBL3 Sp6/T7.

Fig. 3: Restriktionsanalyse und Southern Blot-Analyse der rekombinanten  $\lambda$ -DNA des Phagenklons, der mit einer Sonde aus dem 5'-Bereich der hTC-cDNA hybridisiert.

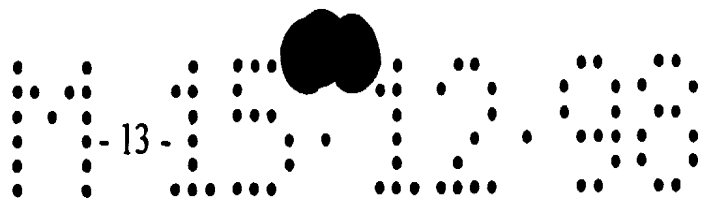
Abb. 1: Die Abbildung zeigt ein Foto eines Ethidiumbromid gefärbten 0,8%igen Agarosegels. Die Spuren 1 und 15 enthalten eine 1 kb Leiter der Firma Gibco als Größenmarker. Die Spuren 2 bis 14 enthalten 250 ng geschnittene  $\lambda$ -DNA vom rekombinanten Phagenklon. Als Enzyme wurden eingesetzt: Spur 2: Sac I, Spur 3: Xho I, Spur 4: Xho I, Xba I, Spur 5: Sac I, Xho I, Spur 6: Sal I, Xho I, Xba I, Spur 7: Sac I, Xho I, Xba I, Spur 8: Sac I, Sal I, Xba I, Spur 9: Sac I, Sal I, BamH I, Spur 10: Sac I, Sal I, Xho I, Spur 11: Not I, Spur 12: Sma I, Spur 13: leer, Spur 14: nicht verdaut.

Abb. 2: Zu Fig.3, Abb.1 korrespondierendes Autoradiogramm einer Southern Blot-Analyse. Als Sonde für die Hybridisierung wurde ein 434 bp langes 5'-hTC-cDNA Fragment eingesetzt.

Fig. 4: DNA-Sequenz der 5'-flankierenden Region und des Promotors vom Gen der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit. Das ATG-Startcodon ist in der Sequenz fett hervorgehoben.

Fig. 5: Identifizierung des Transkriptionsstarts durch Primer Extension-Analyse.

Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm eines denaturierenden Polyacrylamidgels, welches zur Darstellung einer Primer Extension-Analyse gewählt wurde. Als Primer wurde ein Oligonukleotid mit der Sequenz 5'GTTAAGTTGTAGCTTACACTGGTTCTC 3' benutzt. In der Spur 1 wurde die Primer Extension Reaktion aufgetragen. Die Spuren G, A, T, C, stellen die Sequenzreaktionen mit dem gleichen Primer und den entsprechen-



den Dideoxynukleotiden dar. Der fette Pfeil kennzeichnet den Haupt-Transkriptionsstart, die dünnen Pfeile weisen auf drei Neben-Transkriptionsstartpunkte hin.



### Beispiele

Die 5'-flankierende Sequenz des menschlichen Gens für die katalytische Telomerase Untereinheit (ghTC) wurde kloniert, der Startpunkt der Transkription bestimmt und potentielle Bindungsstellen für DNA-bindende Proteine identifiziert.

### Beispiel 1

Durch eine genomische Southern Blot-Analyse wurde bestimmt, ob ghTC im menschlichen Genom ein Einzelgen darstellt oder mehrere Loci für das hTC-Gen bzw. eventuell auch ghTC-Pseudogene existieren.

Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher Zoo-Blot der Firma Clontech einer Southern Blot-Analyse unterzogen. Dieser Blot enthält 4 µg Eco RI geschnittene genomische DNA von neun verschiedenen Spezies (Mensch, Affe, Ratte, Maus, Hund, Rind, Kaninchen, Huhn und Hefe). Mit Ausnahme von Hefe, Huhn und Mensch wurde die DNA aus Nierengewebe isoliert. Die humane genomische DNA wurde aus Plazenta isoliert und die genomische DNA aus Huhn wurde aus Lebergewebe aufgereinigt. Im Autoradiogramm in Fig. 1 wurde als radioaktiv-markierte Sonde ein 1233 bp langes hTC-cDNA Fragment eingesetzt. Die experimentellen Bedingungen für die Hybridisierung und die Waschschrte des Blots erfolgten in Anlehnung an Ausubel *et al.* (1987).

Im Fall der humanen DNA erkennt die Sonde zwei spezifische DNA-Fragmente. Das kleinere, etwa 1,5 bis 1,8 kb lange Eco RI-Fragment geht wahrscheinlich auf zwei Eco RI-Schnittstellen in einem Intron der ghTC-DNA zurück. Aufgrund dieses Ergebnisses ist davon auszugehen, daß nur ein singuläres ghTC-Gen im menschlichen Genom vorliegt.

506 bp langen 5'-hTC-cDNA Fragment hybridisiert. Die experimentellen Bedingungen für Hybridisierung und Waschen der Filter erfolgten in Anlehnung an Ausubel *et al.* (1987).

- 5 Die in dieser Primäruntersuchung identifizierten Phagenklone wurden aufgereinigt. In weitergehenden Analysen stellte sich ein Phagenklon als potentiell positiv heraus. Eine  $\lambda$ -DNA Präparation dieses Phagens und der nachfolgende Restriktionsverdau mit Enzymen, die das genomische Insert in Fragmenten freisetzen, zeigte, daß dieser Phagenklon ein ca. 15 kb Insert im Vektor enthält (Fig. 2).

10

### Beispiel 3

15

Um zu untersuchen, ob auch das 5'-Ende der hTC-cDNA im Insert des rekombinanten Phagenklons vorliegt, wurde  $\lambda$ -DNA des positiven Klons in einer Southern Blot Analyse mit einem radioaktiv markierten 434 bp langen hTC-cDNA Fragment aus dem extremen 5'-Bereich hybridisiert (Fig. 3).

20

Da die isolierte  $\lambda$ -DNA des positiven Klons auch mit dem extremen 5'-Ende der hTC-cDNA hybridisiert, enthält dieser Phage wahrscheinlich auch den das ATG-Startcodon flankierenden 5'-Sequenzbereich.

### Beispiel 4

25

Um das gesamte 15 kb lange Insert des positiven Phagenklons in Teilfragmenten umzuklonieren und anschließend zu sequenzieren, wurden zum DNA-Verdau Restriktionsendonukleasen ausgewählt, die zum einem das gesamte Insert aus EMBL3 Sp3/T7 freisetzen (vgl. Beispiel 2) und zusätzlich im Insert schneiden.

30

Insgesamt wurden ein etwa 8,3 und ein etwa 6,5 kb langes Xho I-Subfragment sowie ein etwa 8,5, ein etwa 3,5 und ein etwa 3 kb langes Sac I-Teilfragment in den Vektor pBluescript umklont.





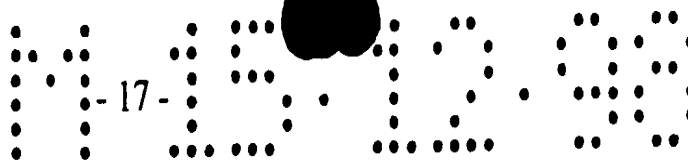
Durch Sequenzanalyse dieser Fragmente wurde die Nukleotidsequenz von 6123 bp 5'-flankierenden des ghTC-Genbereichs, ausgehend vom ATG-Startcodon bestimmt (Fig. 4).

## 5 Beispiel 5

Um den oder die Startpunkt(e) der Transkriptionsinitiation zu ermitteln, wurde das 5'-Ende der hTC-mRNA durch Primer-Extension-Analyse (Ausubel *et al.*, 1987) bestimmt. Hierzu wurden 2 µg PolyA<sup>+</sup>-RNA aus HL-60-Zellen mit 5 pmol radioaktiv markiertem Primer inkubiert und anschließend eine Reverse Transkriptase Reaktion durchgeführt. Das Produkt der Primerverlängerung wurde nach Aufarbeitung gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Autoradiogramm dargestellt (Fig.5).

Hierbei wurde eine Haupt-Transkriptionsstartstelle identifiziert, die 1767 bp 5' vom ATG-Startcodon der hTC-cDNA Sequenz lokalisiert ist (Nukleotidposition 3346 in Fig. 4). Die Nukleotidsequenz um diesen Haupttranskriptionsstart (TTA<sub>+</sub>TTGT) repräsentiert darüberhinaus ein Initiator-Element (Inr), das in 6 von 7 Nukleotiden mit dem Konsensusmotiv (PyPyA<sub>+</sub>Na/tPyPy) (Smale, 1997) eines Initiator-Elementes übereinstimmt.

In unmittelbarer Nähe des experimentell identifizierten Haupt-Transkriptionsstartes konnte keine eindeutige TATA-Box identifiziert werden, so daß der hTC-Promoter wahrscheinlich in die Familie der TATA-losen Promotoren (Smale, 1997) einzuordnen ist. Allerdings wurde durch bioinformatische Analysen eine potentielle TATA-Box von Nukleotidposition 1306 bis 1311 gefunden. Die zusätzlich um den Haupt-Transkriptionsstart beobachteten Neben-Transkriptionsstarts wurden auch bei anderen TATA-losen Promotoren beschrieben (Geng and Johnson, 1993), wie z.B. in den stark regulierten Promotoren einiger Zellzyklusgene (Wick *et al.*, 1995).



## Literaturverzeichnis

5 Allsopp, R. C., Vazire, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. und Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 10114-10118.

10 Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1987). Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences, New York.

Blasco, M. A., Rizen, M., Greider, C. W. und Hanahan, D. (1996). Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multistage tumorigenesis. Nature Genetics 12, 200-204.

15 Broccoli, D., Young, J. W. und deLange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 9082-9086.

20 Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G. Greider, C.W. Harley, C. B. und Bacchetti S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO J. 11, 1921-1929.

25 Feng, J., Funk, W. D., Wang, S.-S., Weinrich, S. L., Avilion, A.A., Chiu, C.-P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., Le, S., West, M.D., Harley, C.B., Andrews, W.H., Greider, C.W. und Villeponteau, B. (1995). The RNA component of human telomerase. Science 269, 1236-1241.



Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C. B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. und Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.

5

Latchman, D.S. (1991). *Eukaryotic transcription factors*. Academic Press Limited, London.

Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V. und Cech T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276: 561-567.

10

Lundblad, V. und Szostak, J. W. (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57, 633-643.

McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26, 234-282.

15

Meyne, J., Ratliff, R. L. und Moyzis, R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 7049-7053.

20

Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. *J. Theor. Biol.* 41, 181-190.

Sandell, L. L. und Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery and chromosome loss. *Cell* 75, 729-739.

25

Smale, S.T. and Baltimore, D. (1989). The „initiator“ as a transcription control element. *Cell* 57:103-113.

Wick, M., Härönen, R., Mumberg, D., Bürger, C., Olsen, B.R., Budarf, M.L., Apte, S. S. and Müller, R. (1995). Structure of the human TIMP-3 gene and its cell-cycle-regulated promoter. Biochemical Journal 311, 549-554.

- 5 Zakian, V. A. (1995). Telomeres: Beginning to understand the end. Science 270, 1601-1607.



### Patentansprüche

1. 5'-flankierende regulatorische DNA-Sequenz für das Gen der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit gemäß Fig. 4 sowie regulatorisch wirksame Fragmente dieser DNA-Sequenz.
2. Rekombinantes Konstrukt, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1.
3. Rekombinantes Konstrukt gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin eine oder mehrere DNA-Sequenzen enthält, die für Polypeptide oder Proteine kodieren.
4. Rekombinantes Konstrukt gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es eine DNA-Sequenz enthält, die für ein antitumorales Protein kodiert.
5. Rekombinantes Konstrukt gemäß Anspruch 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es eine oder mehrere DNA-Sequenzen enthält, die für ein Reporterprotein kodieren.
6. Vektor, enthaltend ein rekombinantes Konstrukt gemäß Ansprüchen 2 bis 5.
7. Vektor gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Virus ist.
8. Vektor gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Plasmid ist.
9. Verwendung von rekombinanten Konstrukten bzw. Vektoren gemäß Ansprüchen 2 bis 8 zur Herstellung von Arzneimitteln.
10. Rekombinante Wirtszellen, enthaltend rekombinante Konstrukte bzw. Vektoren gemäß Ansprüchen 2 bis 8.

11. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Promotor-, Silencer- oder Enhanceraktivität der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit beeinflussen, das folgende Schritte umfaßt:
- 5           A.     Zugabe einer Kandidatensubstanz zu einer Wirtszelle, enthaltend DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1, funktionell verknüpft mit einem Reportergen,
- B.     Messung des Substanzeffektes auf die Reportergenexpression.
- 10
12. Verfahren zur Identifizierung von Faktoren, die spezifisch an die DNA gemäß Anspruch 1 oder an Fragmente davon binden, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressions-cDNA-Bibliothek mit einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder Teilfragmenten unterschiedlichster Länge als Sonde screent.
- 15
13. Transgene Tiere, enthaltend rekombinante Konstrukte bzw. Vektoren gemäß Ansprüchen 2 bis 8.
14. Verfahren zur Detektion Telomerase-assoziiierter Zustände in einem Patienten, das folgende Schritte umfaßt:
- 20           A.     Inkubation eines rekombinanten Konstruktes bzw. Vektors gemäß Ansprüchen 5 bis 8 mit Körperflüssigkeiten oder zellulären Proben,
- B.     Detektion der Reportergenaktivität, um einen diagnostischen Wert zu erhalten,
- 25           C.     Vergleich des diagnostischen Wertes mit Standardwerten für das Reportergenkonstrukt in standardisierten normalen Zellen oder
- 30                   Körperflüssigkeiten des gleichen Typs wie die Testprobe.

**Regulatorische DNA-Sequenzen aus der 5'-Region vom Gen der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit und deren diagnostische und therapeutische Verwendung**

**Z u s a m m e n f a s s u n g**

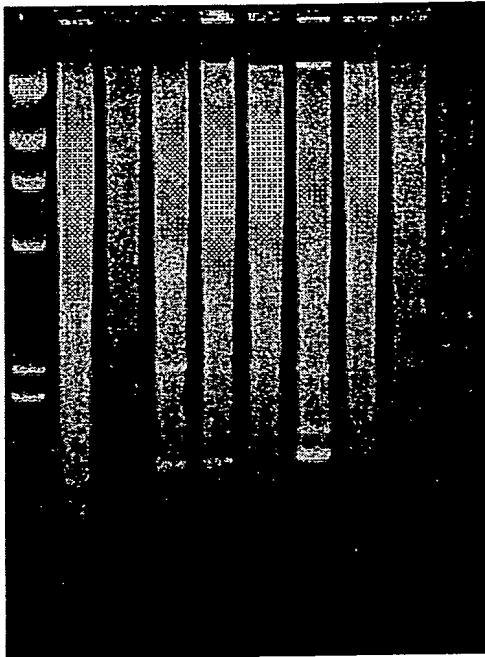
Diese Erfindung betrifft 5'-flankierende regulatorische DNA-Sequenzen, beinhaltend Promotorsequenzen für das Gen der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit. Darüberhinaus betrifft diese Erfindung die Verwendung dieser regulatorischen DNA-Sequenzen für pharmazeutische, diagnostische und therapeutische Zwecke, vor allem in der Behandlung von Krebs und Alterung.

14 15 12 99

**Fig. 1**

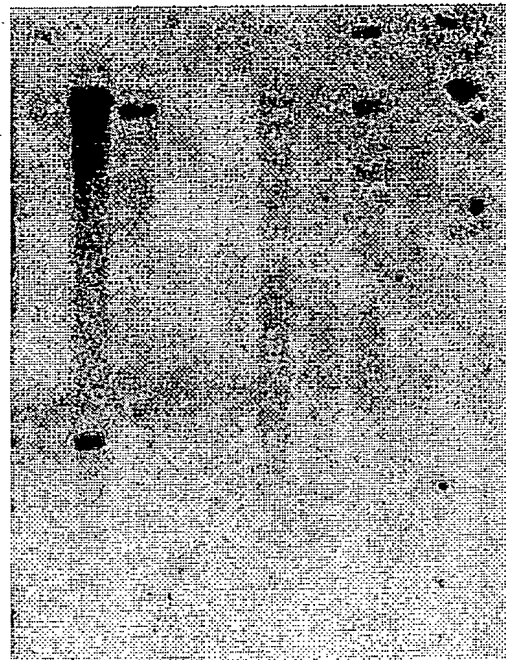
**Abb. 1**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



**Abb.2**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

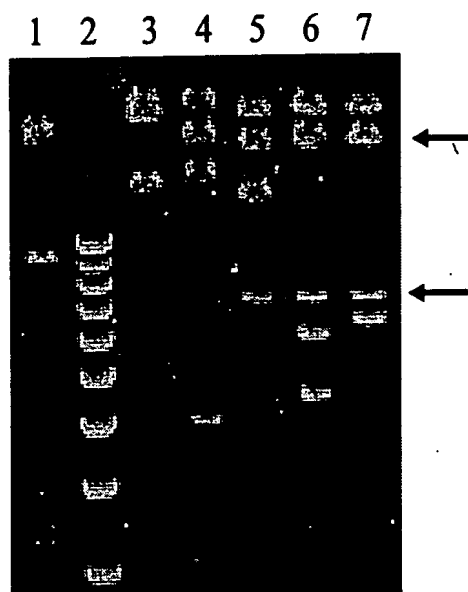




Le A 32 805

M 15.12.98

**Fig. 2**



M 15.12.98

Fig. 3

Abb.1

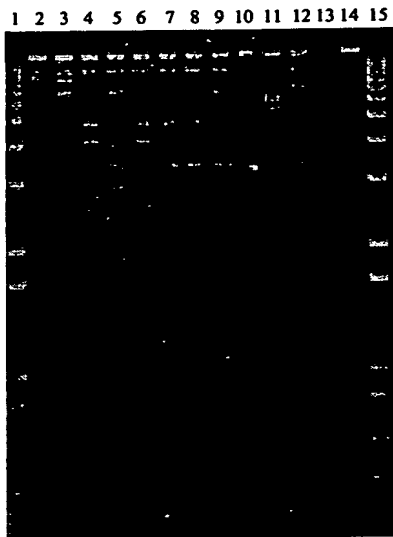


Abb.2

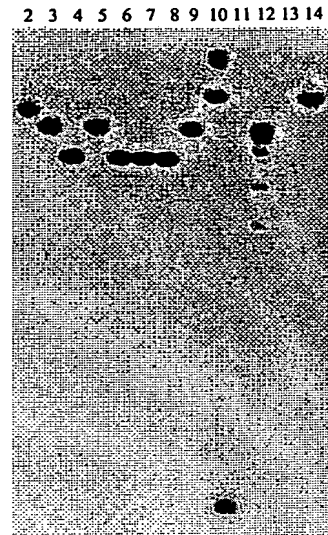


Fig. 4

GAGCTCTGAA	CCGTGGAAC	GAACATGACC	CTTGCTGCCC	TGCTTCCCTG	GGTGGGTCAA	GGGTAATGAA	70
GTGGTGTGCA	GGAAATGGCC	ATGTAAATTA	CACGACTCTG	CTGATGGGGA	CCGTTCCCTC	CATCATTTATT	140
CATCTTCACC	CCCAAGGACT	GAATGATTCC	AGCAACTTCT	TCGGGTGTGA	CAAGCCATGA	CAAAACTCAG	210
TACAAACACC	ACTCTTTTAC	TAGGCCACCA	GAGCACGGGC	CACACCCCTG	ATATATTAAG	AGTCCAGGAG	280
AGATGAGGCT	GCTTTTCAGCC	ACCAGGCTGG	GGTGACAACA	GCGGCTGAAC	AGTCTGTTCC	TCTAGACTAG	350
TAGACCCTGG	CAGGCACTCC	CCCAAATTCT	AGGGCCTGGT	TGCTGCTTCC	CGAGGGCGCC	ATCTGCCCTG	420
GAGACTCAGC	CTGGGGTGCC	ACACTGAGGC	CAGCCCTGTC	TCCACACCCT	CCGCCTCCAG	CGCTCAGCTT	490
CTCCAGCAGC	TTCTTAAACC	CTGGGTGGGC	CGTGTTCGAC	CGCTACTGTC	TCACCTGTCC	CACTGTGTCT	560
TGTCTCAGCG	ACGTAGCTCG	CACGGTTCCT	CCTCACATGG	GGTGTCTGTC	TCCTTCCCCA	ACACTCACAT	630
GCGTTGAAGG	GAGGAGATTG	TGCGCCTCCC	AGACTGGCTC	CTCTGAGCCT	GAACCTGGCT	CGTGGCCCCC	700
GATGCAGGTT	CCTGGCGTCC	GGCTGCACGC	TGACCTCCAT	TTCCAGGCGC	TCCCCGTCTC	CTGTCTCTG	770
CCGGGGCCTG	CCGGTGTGTT	CTTCTGTTTC	TGTGCTCCTT	TCCACGTCCA	GCTGCGTGTG	TCTCTGCCCG	840
CTAGGGTCTC	GGGGTTTTTA	TAGGCATAGG	ACGGGGGCGT	GGTGGGCCAG	GGCGCTCTTG	GGAAATGCAA	910
CATTTGGGTG	TGAAAGTAGG	AGTGCCTGTC	CTCACCTAGG	TCCACGGGCA	CAGGCTGGG	GATGGAGCCC	980
CCGCCAGGGA	CCCGCCCTTC	TCTGCCCAGC	ACTTTCTAGC	CCCCCTCCCT	CTGGAACACA	GAGTGGCAGT	1050
TTCCACAAGC	ACTAAGCATC	CTCTTCCCAA	AAGACCCAGC	ATTGGCACCC	CTGGACATTT	GCCCCACAGC	1120
CCTGGGAATT	CACGTGACTA	CGCACATCAT	GTACACACTC	CCGTCCACGA	CCGACCCCCG	CTGTTTTATT	1190
TTAATAGCTA	CAAAGCAGGG	AAATCCCTGC	TAAAATGTCC	TTTAACAAAC	TGGTTAAACA	AACGGGTCCA	1260
TCCGCACGGT	GGACAGTTCC	TCACAGTGAA	GAGGAACATG	CCGTTTATAA	AGCCTGCAGG	CATCTCAAGG	1330
ATTACGCT	GAGTCAAAAC	TGCCACCTCC	ATGGGATACG	TACGCAACAT	GCTCAAAAAG	AAAGAAATTC	1400
CCCATGGC	AGGGGAGTGG	TTAGGGGGGT	TAAGGACGGT	GGGGGCGGCA	GCTGGGGGCT	ACTGACGCGA	1470
CTTTTACTA	AAGCCAGTTT	CCTGGTTCTG	ATGGTATTGG	CTCAGTTATG	GGAGACTAAC	CATAGGGGAG	1540
TGGGGATGGG	GGAAACCCGA	GGCTGTGCCA	CTTTTGCCAT	GCCCCAGTGT	CCTGGGCAGG	ATAATGCTCT	1610
AGAGATGCC	ACGTCTGAT	TCCCCCAAAC	CTGTGGACAG	AACCCGCCCC	GCCCCAGGGC	CTTTGCAGGT	1680
GTGATCTCCG	TGAGGACCCT	GAGGTCTGGG	ATCCTTCGGG	ACTACCTGCA	GGCCCGAAAA	GTAATCCAGG	1750
GGTCTGCGGA	AGAGGCGGGC	AGGAGGGTCA	GAGGGGGGCA	GCCTCAGGAC	GATGGAGGCA	GTCAGTCTGA	1820
GGCTGAAAAG	GGAGGGAGGG	CCTCGAGCCC	AGGCTGCAA	GCGCTCCAG	AAGCTGGAAA	AAGCGGGGAA	1890
GGGACCCTCC	ACGGAGCCTG	CAGCAGGAAG	GCACGGCTGG	CCCTTAGCCC	ACCAGGGCCC	ATCTGGAGC	1960
TCCGGCCTCC	GTGCCATAGG	AGGGCACTCG	CGCTGCCCTT	CTAGCATGAA	GTGTGTGGGG	ATTTGGAGAA	2030
GCAACAGGAA	ACCCATGCAC	TGTGAATCTA	GGATTATTTC	AAAACAAAAG	TTTACAGAAA	CATCCAAGGA	2100
CAGGGCTGAA	GTGCCTCCGG	GCAAGGGCAG	GGCAGGCACG	AGTGATTTTA	TTTAGCTATT	TTATTTTATT	2170
TACTTACTTT	CTGAGACAGA	GTTATGCTCT	TGTTGCCAG	GCTGGAGTGC	AGCGGCATGA	TCTTGGCTCA	2240
CTGCAACCTC	CGTCTCCTGG	GTTCAAGCAA	TTCTCGTGCC	TCAGCTCCCC	AAGTAGCTGG	GATTTTCAGG	2310
GTGCACCACC	ACACCCGGCT	AATTTTGAT	TTTTAGTAGA	GATGGGCTTT	CACCATGTTG	GTCAAGCTGA	2380
TCTCAAAATC	CTGACCTCAG	GTGATCCGCC	CACCTCAGCC	TCCCAAAGTG	CTGGGATTAC	AGGCATGAGC	2450
CACTGCACCT	GGCCTATTTA	ACCATTTTAA	AACCTCCCTG	GGCTCAAGTC	ACACCCACTG	GTAAGGAGTT	2520
CATGGAGTTC	AATTTCCCCT	TTACTCAGGA	GTTTACCTCC	TTTGATATTT	TCTGTAATTC	TTCTGAGACT	2590
GGGGATACAC	CGTCTCTTGA	CATATTCACA	GTTTCTGTGA	CCACCTGTTA	TCCCATGGGA	CCCACTGCAG	2660
GGGCAGCTGG	GAGGCTGCAG	GCTTCAGGTC	CCAGTGGGGT	TGCCATCTGC	CAGTAGAAAC	CTGATGTAGA	2730
ATCAGGGGCG	AAGTGTGGAC	ACTGTCTCTG	ATCTCAATGT	CTCAGTGTGT	GCTGAAACAT	GTAGAAATTA	2800
GTCCATCC	CTCCTACTCT	ACTGGGATTG	AGCCCCCTCC	CTATCCCCC	CCAGGGGCGG	AGGAGTTCTC	2870
ACTCCTG	TGAGGAAGG	AATGATACTT	TGTTATTTTT	CACTGCTGGT	ACTGAATCCA	CTGTTTCATT	2940
TTTGGTTTG	TTTGTTTTGT	TTTGAGAGGC	GGTTTCACTC	TTGTGTCTCA	GGCTGGAGGG	AGTGCAATGG	3010
CGCGATCTTG	GCTTACTGCA	GCCTCTGCCT	CCCAGGTTCA	AGTGATTCTC	CTGCTTCCGC	CTCCCATTG	3080
GCTGGGATTA	CAGGCACCCG	CCACCATGCC	CAGCTAATTT	TTTGTATTTT	TAGTAGAGAC	GGGGGTGGGT	3150
GGGGTTCACC	ATGTTGGCCA	GGCTGGTCTC	GAACCTCTGA	CCTCAGATGA	TCCACCTGCC	TCTGCCTCCT	3220
AAAGTGCTGG	GATTACAGGT	GTGAGCCACC	ATGCCAGCT	CAGAATTTAC	TCTGTTTAGA	AACATCTGGG	3290
TCTGAGGTAG	GAAGCTCACC	CCACTCAAGT	GTTGTGGTGT	TTTAAGCCAA	TGATAGAAAT	TTTTTATTGT	3360
TGTTAGAACAA	CTCTTGATGT	TTTACACTGT	GATGACTAAG	ACATCATCAG	CTTTTCAAAG	ACACACTAAC	3430
TGCACCCATA	ATACTGGGGT	GTCTTCTGGG	TATCAGCAAT	CTTCATTGAA	TGCCGGGAGG	CGTTTCCCTG	3500
CCATGCACAT	GGTGTTAATT	ACTCCAGCAT	AATCTTCTGC	TTCCATTCT	TCTCTTCCCT	CTTTTAAAT	3570
TGTGTTTTCT	ATGTTGGCTT	CTCTGCAGAG	AACCAAGTGA	AGCTACAAC	TAACTTTTGT	TGGAACAAAT	3640
TTCCAAACCC	CCCCCTTTCG	CCTAGTGGCA	GAGACAATTC	ACAAACACAG	CCCTTTAAAA	AGGCTTAGGG	3710
ATCACTAAGG	GGATTTCTAG	AAGAGCGACC	TGTAATCCTA	AGTATTTACA	AGACGAGGCT	AACCTCCAGC	3780
GAGCGTGACA	GCCCAGGGAG	GGTGCAGGCG	CTGTTCAAAT	GCTAGCTCCA	TAAATAAAGC	AATTTCTCTC	3850
GGCAGTTTCT	GAAAGTAGGA	AAGGTTACAT	TTAAGGTTGC	GTTTGTAGC	ATTTCAAGTGT	TTGCCGACCT	3920
CAGCTACAGC	ATCCCTGCAA	GGCCTCGGGA	GACCCAGAAG	TTTCTCGCCC	CCTTAGATCC	AAACTTAGAGC	3990
AACCCGGAGT	CTGGATTCTT	GGGAAGTCCT	CAGCTGTCTC	GCGGTTGTGC	CGGGGCCCCA	GGTCTGGAGG	4060
GGACCAGTGG	CCGTGTGGCT	TCTACTGCTG	GGCTGGAAGT	CGGGCCTCCT	AGCTCTGCAG	TCCGAGGCTT	4130
GGAGCCAGGT	CCCTGGACCC	CGAGGCTGCC	CTCCACCCTG	TGCGGGCGGG	ATGTGACCAG	ATGTTGGCCT	4200
CATCTGCCAG	ACAGAGTGCC	GGGGCCAGG	GTCAAGGCCG	TTGTGGCTGG	TGTGAGGCGC	CCGGTGCAGG	4270
GCCAGCAGGA	GCGCCTGGCT	CCATTTCCCA	CCCTTTCTCG	ACGGGACCGC	CCCGGTGGGT	GATTAACAGA	4340
TTTGGGGTGG	TTTGCTCATG	GTGGGGACCC	CTCGCCGCTT	GAGAACCTGC	AAAGAGAAAT	GACGGGCCTG	4410

M 15.12.99

TGTCAAGGAG	CCCAAGTCGC	GGGGAAGTGT	TGCAGGGAGG	CACTCCGGGA	GGTCCC CGT	GCCCGTCCAG	4480
GGAGCAATGC	GTCCTCGGGT	TCGTCCCCAG	CCGCGTCTAC	GCGCCTCCGT	CCTCCCCTTC	ACGTCCGGCA	4550
TTCGTGGTGC	CCGGAGCCCG	ACGCCCCGCG	TCCGGACCTG	GAGGCAGCCC	TGGGTCTCCG	GATCAGGCCA	4620
GCGGCCAAAG	GGTCGCCGCA	CGCACCTGTT	CCCAGGGCCT	CCACATCATG	GCCCCCTCCCT	CGGGTTACCC	4690
CACAGCCTAG	GCCGATTCTGA	CCTCTCTCCG	CTGGGGCCCT	CGCTGGCGTC	CCTGCACCCT	GGGAGCGCGA	4760
GCGGCGCGCG	GGCGGGGAAG	CGCGGCCAG	ACCCCCGGGT	CCGCCCCGAG	CAGCTGCGCT	GTCGGGGCCA	4830
GGCCGGGCTC	CCAGTGGATT	CGCGGGCACA	GACGCCCAGG	ACCGCGCTCC	CCACGTGGCG	GAGGGACTGG	4900
GGACCCGGGC	ACCCGTCTTG	CCCCTTCACC	TTCCAGCTCC	GCCTCCTCCG	CGCGGACCCC	GCCCCGTCCC	4970
GACCCCTCCC	GGGTCCCCCG	CCCAGCCCCC	TCCGGGCCCT	CCCAGCCCCCT	CCCCTTCCTT	TCCGCGGCCC	5040
CGCCCTCTCC	TCGCGGCGCG	AGTTTCAGGC	AGCGCTGCGT	CCTGCTGCGC	ACGTGGGAAG	CCCTGGCCCC	6110
GGCCACCCCC	GCGATG						6126

M 15.10.98

Fig. 5

